

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

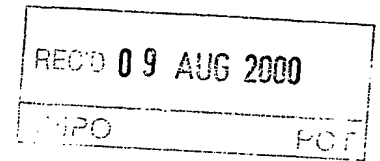
IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

10/018373



DE 00/01777

4

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 199 25 739.6

Anmeldetag: 7. Juni 1999

Anmelder/Inhaber: BioteCon Gesellschaft für Biotechnologische Entwicklung und Consulting mbH, Berlin/DE

Bezeichnung: Therapeutikum mit einem Botulinum-Neurotoxin

IPC: A 61 K 35/74

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 25. Juli 2000
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Weihmays

**PRIORITY
DOCUMENT**SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Therapeutikum mit einem Botulinum-Neurotoxin.

7. Juni 1999/hl

✓
Unser Zeichen: 10033
Neue deutsche Patentanmeldung
BioteCon Gesellschaft für
Biotechnologische Entwicklung und Consulting mbH

Hintergrund der Erfindung

ms
Clostridium botulinum Toxinkomplex Typ A (M_r 900.000) wird seit mehreren Jahren zur Therapie verschiedener Dystonien eingesetzt. Derzeit sind zwei verschiedene Präparate für die Behandlung des *Blepharospasmus*, hämifacialer Spasmen und des *Torticollis spasmodicus* zugelassen, und zwar BOTOX® und DYSPORT®. Die Therapie weiterer Erkrankungen des Nervensystems (z. B. Spastizitäten, Migräne, Lumbalgie, Cervicalsyndrom, Hypersalivation) wird derzeit klinisch geprüft. Die Präparate werden außerdem bei kosmetischen Indikationen wie z. B. Hyperhydrose und ausgeprägter Faltenbildung im Gesichtsbereich eingesetzt.

Botullinumtoxin-Komplexe setzen sich aus einem Gemisch clostridieller Proteine zusammen. Dies sind Hämagglutinine mit unterschiedlichen Molekularmassen, ein nicht-toxisches, nicht-hämagglutinierendes Protein (M_r 120.000) und zwei Neurotoxinmoleküle (M_r 150.000). Sie bilden einen losen Komplex, der für die orale Toxizität bei Lebensmittelintoxikationen verantwortlich ist. Im Gegensatz zum reinen Neurotoxin widersteht der Komplex dem aggressiven Milieu im Magen-Darm-Trakt und ermöglicht die enterale Resorption des Neurotoxins, welches über den Blutkreislauf oder das Lymphsystem die Zielzellen erreicht und dort eine Blockade der Transmitterfreisetzung auslöst. Daraufhin kommt es zur Paralyse der quergestreiften und glatten Muskulatur und zum Versiegen verschieden vegetativer Funktionen. Vergiftete Patienten sterben an einer Insuffizienz der respiratorischen Muskulatur. Da das reine Neurotoxin im Ma-

gen-Darm-Trakt abgebaut und somit nicht enteral resorbiert wird, ist es nach einer Ingestion nicht giftig. Parenteral appliziert unterscheiden sich die Wirkungen des Komplexes nicht von den Wirkungen des Neurotoxins, denn der Komplex zerfällt im Gewebe in seine Bestandteile, und nur das Neurotoxin wird in die Zielzellen aufgenommen.

Zur therapeutischen Anwendung wird der Komplex direkt in dystone oder spastische Muskel injiziert, wo das Neurotoxin aus dem Komplex freigesetzt wird und die erwünschte pharmakologische Wirkung hervorruft. Obwohl der Komplex nur in äußerst geringen Dosen appliziert wird (1-25ng, je nach Indikation und Größe des betroffenen Muskels), kommt es nach wiederholten Injektionen bei einer beträchtlichen Anzahl der Patienten zur Bildung von spezifischen, neutralisierenden Antikörpern, die auch gegen das Neurotoxin gerichtet sind. Diese Patienten sprechen auf keines der beiden Präparate mehr an. Sie könnten aber mit anderen Toxinsubtypen behandelt werden, von denen allerdings keiner zur Therapie zugelassen ist.

Die Bildung von spezifischen Antikörpern wird durch zwei Faktoren begünstigt. Zum einen bleibt das Neurotoxin, fixiert im Komplex, über einen langen Zeitraum im Gewebe liegen und kann ins Gewebe hineinwandernde Immunzellen zur Antikörperbildung aktivieren. Die lange Verweildauer führt nicht zu einer gesteigerten Aufnahme in die Zielzellen, denn vergiftete Zellen können kein Toxin mehr aufnehmen. Das langsam aus dem Komplex herausdissoziierende Toxin ist also nur noch immunologisch wirksam. Zum anderen verstärken die im Komplex enthaltenden Proteine eine Immunantwort. Hämagglutine sind Lektine, Proteine, die sich durch eine hohe Affinität zu bestimmten Zuckern auszeichnen. Aufgrund ihrer Bindung an Zuckerstrukturen wirken Lektine immunstimulierend. So konnte gezeigt werden, daß die Lektine Concanavalin A, Phytohämagglutinin und Pokeweed Mitogen T- und B-Lymphozyten aktivieren. Die Hämagglutine des Botulinumtoxin-Komplexes, die ebenfalls an membranständige Zucker binden, können also in ähnlicher Weise als Immunadjuvantien fungieren und zur Antikörperbildung und damit zum Therapieversagen beitragen.

Als Alternative zu den beiden kommerziellen Präparaten aus Botulinumtoxinkomplex, BOTOX® und DYSPORT®, wurde ein neues Arzneimittel entwickelt, welches nur rines

Neurotoxin enthält und frei von Hämagglutininen und anderen körperfremden Proteinen ist. Wegen seiner geringeren Molekularmasse diffundiert es schneller zu den Zielzellen, in die es aufgenommen wird, bevor Immunzellen, von Hämagglutininen angelockt, aktiviert werden. In Antigenitätsstudien fanden wir, daß dieses Präparat - im Unterschied zu kommerziellen Präparaten - keine Bildung von Antikörpern auslöst. Bei therapeutischem Einsatz dieses neuentwickelten Arzneimittels sollte es auch nach wiederholten Applikationen nicht zu einem antikörperbedingtem Therapieversagen kommen. Ferner konnte gezeigt werden, daß das reine Neurotoxin, und zwar wegen seiner sofortigen Bioverfügbarkeit, sich auch weiterhin zur Therapie von Patienten eignet, die unter der Behandlung mit BOTOX® oder DYSPORT® einen Antikörpertiter entwickelt haben.

Beschreibung der Erfindung

Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Therapeutikum, **gekennzeichnet** durch ein Botulinum-Neurotoxin von Clostridium botulinum Typ A, frei von sonstigen Proteinen des Botulinumtoxin-Komplexes, insbesondere frei von Hämagglutininen und nicht-toxischen nicht-hämagglutinierenden Proteinen.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Therapeutikum, **gekennzeichnet** durch ein Botulinum-Neurotoxin von Clostridium botulinum Typ B, C, insbesondere C1, D, E, F und/oder G, frei von sonstigen Proteinen des Botulinum-Komplexes, insbesondere frei von Hämagglutininen und nicht-toxischen nicht-hämagglutinierenden Proteinen.

Dieses Therapeutikum kann durch ein Botulinum-Neurotoxin von Clostridium botulinum Typ B gekennzeichnet sein.

Ein Therapeutikum gemäß der Erfindung kann durch ein in an sich bekannter Weise gewonnenes Botulinum-Neurotoxin oder durch ein rekombinantes Botulinum-Neurotoxin gekennzeichnet sein.

Therapeutikum gemäß der Erfindung kann durch ein Botulinum-Neurotoxin eines Reinheitsgrades (hochreines Botulinum-Neurotoxin) gekennzeichnet sein, der zu keiner oder zu einer verminderten Induktion neutralisierender Antikörper führt, verglichen mit seinem Botulinumtoxin-Komplex.

Ferner kann ein Therapeutikum gemäß als lyophilisiertes Präparat mit einem fakultativen Gehalt an einem therapeutisch üblichen Träger, Verdünnungsmittel und/oder Hilfsstoff vorliegen.

Auch kann ein Therapeutikum gemäß der Erfindung als flüssiges Präparat vorliegen, insbesondere als Infusionspräparat, vorzugsweise auf wäßriger Basis, gegebenenfalls erhältlich durch Aufnahme eines erfindungsgemäßen lyophilisierten Präparats in Wasser oder Saline.

Ein erfindungsgemäßes Therapeutikum kann zur Therapie von Erkrankungen des Nervensystems vorgesehen sein.

Ferner kann ein erfindungsgemäßes Therapeutikum zur Therapie von Secondary Non-Responders vorgesehen sein.

Ferner kann ein erfindungsgemäßes Therapeutikum zur Therapie von

- Dystonien, insbesondere Torticollis spasmodicus oder Blepharospasmus,
 - Spastizitäten, insbesondere Spitzfuß,
 - hämifascialen Spasmen,
 - Migräne,
 - Lumbalgie,
 - Cervicalsyndrom oder
 - Hypersalivation
- vorgesehen sein.

Ferner kann ein erfindungsgemäßes Therapeutikum für kosmetische Indikation, insbesondere Hyperhydrose oder ausgeprägte Faltenbildung im Gesichtsbereich vorgesehen sein.

Ferner kann ein erfindungsgemäßes Therapeutikum zur Therapie von Patienten mit neutralisierenden Antikörpern gegen einen Botulinum-Komplex vorgesehen sein.

Ferner kann ein erfindungsgemäßes Therapeutikum mit einem Botulinum-Neurotoxin von *Clostridium botulinum* Typ A zur Therapie von Patienten mit neutralisierenden Antikörpern gegen einen Botulinumtoxin-Komplex von *Clostridium botulinum* Typ A vorgesehen sein.

Schließlich kann ein erfindungsgemäßes Therapeutikum mit einem Botulinum-Neurotoxin von *Clostridium botulinum* Typ B zur Therapie von Patienten mit neutralisierenden Antikörpern gegen einen Botulinumtoxin-Komplex von *Clostridium botulinum* Typ B vorgesehen sein.

Beispiel 1

20 Kaninchen wurden 25 U BOTOX®, über einen Zeitraum von 12 Wochen im Abstand von 14 Tagen (5 Injektionen) intracutan injiziert. Nach 3 Wochen und im weiteren im Abstand von 14 Tagen wurde Serum gewonnen.

Antikörper gegen *Clostridium botulinum* Toxin A wurden mit einem Enzymimmunoassay nachgewiesen, in dem das homogene Neurotoxin auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert war. An das Neurotoxin bindende Antikörper wurden mittels eines zweiten, enzymmarkierten Antikörpers quantifiziert.

Das Ergebnis ist in Tabelle 1 dargestellt. In Seren von 17 Tiere konnten nach 11 Wochen Antikörper nachgewiesen werden. Im biologischen Aktivitätstest wurde gezeigt, daß 12 der 17 Seren neutralisierende Antikörper enthielten (Tab. 2).

Tab. 1

Bestimmung von Serumproben (1:100 verdünnt) aus Kaninchen, die mit BOTOX® behandelt wurden. O. D._{490nm} > 0.1 sind angegeben. Alle O. D. Werte sind korrigiert mit den O. D. Werten der Präimmunseren (O.D. ca. 0,150).

Kanin. Nr.	3. Woche	5. Woche	7. Woche	9. Woche	11. Woche
1	-	-	-	0,11	0,36
2	-	-	-	2,36	2,23
3	-	-	0,57	1,43	1,44
4	-	-	0,68	1,68	0,93
5	-	0,97	3,52	3,49	3,44
6	-	-	1,34	2,32	2,70
7	-	-	2,13	3,09	3,00
8*	-	0,53	1,47	2,75	2,75
9	-	-	0,43	2,44	2,85
10	-	-	2,99	3,15	2,73
11	-	0,10	2,42	2,45	1,93
12	-	-	-	1,13	1,95
13	-	-	-	-	1,89
14	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-
17	-	2,93	3,62	3,72	3,44
18	-	-	1,18	2,28	2,62
19	-	-	0,43	0,43	0,81
20	-	1,65	3,20	2,97	2,88

*Werte wurden nicht korrigiert, da kein Präimmunserum vorhanden war.

Tab. 2 Neutralisierung durch Seren von Kaninchen, die mit BOTOX® (Woche 11 nach der ersten Immunisierung) im Maus-Hemidiaphragma-Assay (Nachweisgrenze: 0,35 mU Antikörper)

Kaninchen	Neutralisation
1	2,0 mU
2	n. d.
3	n. d.
4	> 10 mU
5	> 100 mU
6	n. d.
7	> 10 mU
8	> 10 mU
9	n. d.
10	n. d.
11	n. d.
12	> 10 mU
13	n. d.
14	n. d.
15	< 0,35 mU
16	0,4 mU
17	> 10 mU
18	> 10 mU
19	2,0 mU
20	> 10 mU

n. d. = nicht bestimmt

Beispiel 2

Nachdem gezeigt wurde, daß der Komplex aus Neurotoxin und Hämagglutininen und dem nicht-toxischen, nicht-hämagglutinierenden Proteinen die Bildung neutralisierende Antikörper auslöst, wurde die immunogene Wirkung des reinen Neurotoxins geprüft. Dazu wurden 8 Kaninchen mit dem Toxinkomplex und 12 Kaninchen mit dem reinen Toxin behandelt. Nach dem oben beschriebenen Verfahren (s. Beispiel 1) wurden 25U des jeweiligen Präparates intracutan appliziert. Die Menge an Neurotoxin, gemessen als Gewicht, war in beiden Präparaten gleich (200pg/Dosis), wie in einem ELISA nachgewiesen wurde. BOTOX® enthielt zusätzlich noch Komplexproteine (ca. 800 pg/Dosis).

Vier der acht mit BOTOX® behandelten Tiere zeigten im ELISA einen Antikörpertiter, während bei den 12 mit reinem Neurotoxin behandelten Tieren keine Antikörper gegen das reine Neurotoxin nachzuweisen waren. Das Ergebnis wurde im biologischen Aktivitätstest bestätigt. Alle vier Kaninchenserum enthielten neutralisierende Antikörper, die eine Toxinwirkung verhinderten (Tab. 3).

Tab. 3 Neutralisation durch Seren (1:3 verdünnt) von Kaninchen, die mit BOTOX® (Woche 11 nach der ersten Immunisierung) im Maus-Hemidiaphragma-Assay (Nachweisgrenze: 1 mU Antikörper)

Kaninchen	Neutralisation
1	12 mU
2	> 30 mU
3	4.5 mU
8	> 30 mU

Beispiel 3

In diesem Experiment wurde die Antikörperbildung durch BOTOX® mit der durch DYSPORT® verglichen. Hierzu wurden jeweils zehn Kaninchen entweder mit BOTOX® (Gruppe 1), mit DYSPORT® (Gruppe 2) oder mit dem reinen Neurotoxin (Gruppe 3) nach beschriebenen Schema behandelt.

Während in Gruppe 1, 2 mehr als 50 % der Tiere einen neutralisierende Antikörpertiter bildeten, waren die Seren aus den Tieren der Gruppe 3 frei von Antikörpern.

Beispiel 4

Ein Patient (Alter 45 Jahre) der über einen Zeitraum von 5 Jahren wegen eines *Torticollis spasmodicus* mit BOTOX® behandelt wurde, hatte einen Antikörpertiter von 3 mU/mL Serum entwickelt. Weder BOTOX® noch DYSPORT® waren bei diesem Patienten therapeutisch wirksam. Ein Therapieversuch mit dem reinen Botulinum Neurotoxins in einer Dosis von 145 Units, welche äquivalent der zuletzt injizierten Dosis von BOTOX® war, führte innerhalb von 72 Stunden zur Lockerung des Muskels, zur Normalisierung der Kopfhaltung und zum Verschwinden des Muskelschmerzes. Unerwünschte Wirkungen traten nicht auf.

Beispiel 5

Ein Patient (Alter 52 Jahre) wurde 3 Jahre wegen Cerebralparese mit BOTOX behandelt. Er hatte einen Antikörpertiter von 10 mU/mL Serum entwickelt, die Therapie mußte deshalb abgebrochen werden. Die Injektion von 200 Units reinen Neurotoxin ermöglichte eine erfolgreiche Therapie.

Literatur:

Ahnert-Hilger G., Bigalke H. (1995)
Molecular aspects of tetanus and botulinum neurotoxin poisoning.
Progress in Neurobiology 46: 83-96

Benecke R., Kessler K.R. (1995)
Botulinumtoxin A
Akt. Neurol. 22: 209-213

Binscheck T., Wellhöner H.H. (1997)
Tetanus and botulinum toxins - zinc proteases - synaptotagmin -
exocytosis.
In: Toxins and signal transduction
(Eds.: Gutman Y., Lazarovici P.) 1: 457-487

Binz, T. , Kurazono, H., M., Frevert, J. , Wernars, K. & Nie-
mann, H. (1990)
The complete sequence of botulinum toxin A and comparison with
other clostridial neurotoxins
J.Biol.Chem. 265: 9153-9158

Cardoso, F. & Jancovic, J. (1995)
Clinical use of botulinum neurotoxins
Current Topics Microbiol.Imunol. 195: 123-141

Marxen P., Fuhrmann U., Bigalke H. (1989)
Gangliosides mediate inhibitory effects of tetanus and botulinum
A neurotoxins on exocytosis in chromaffin
cells.
Toxicon 27: 849-859

7. Juni 1999/hl

Unser Zeichen: 10033
Neue deutsche Patentanmeldung
BioteCon Gesellschaft für
Biochnologische Entwicklung und Consulting mbH

Patentansprüche

1. Therapeutikum, gekennzeichnet durch ein Botulinum-Neurotoxin von Clostridium botulinum Typ A, frei von sonstigen Proteinen des Botulinumtoxin-Komplexes, insbesondere frei von Hämagglutinen und nicht-toxischen nicht-hämagglutinierenden Proteinen.
2. Therapeutikum, gekennzeichnet durch ein Botulinum-Neurotoxin von Clostridium botulinum Typ B, C, insbesondere C1, D, E, F und/oder G, frei von sonstigen Proteinen des Botulinum-Komplexes, insbesondere frei von Hämagglutinen und nicht-toxischen nicht-hämagglutinierenden Proteinen.
3. Therapeutikum nach Anspruch 2, gekennzeichnet durch ein Botulinum-Neurotoxin von Clostridium botulinum Typ B.

4. Therapeutikum nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß des Botulinum-Neurotoxin ein natürliches oder rekombinantes Neurotoxin ist.
5. Therapeutikum nach einem der vorhergehenden Ansprüche, gekennzeichnet durch ein Botulinum-Neurotoxin eines Reinheitsgrades (hochreines Botulinum-Neurotoxin), der zu keiner oder zu einer verminderten Induktion neutralisierender Antikörper führt, verglichen mit seinem Botulinumtoxin-Komplex.
6. Therapeutikum nach einem der vorhergehenden Ansprüche als lyophilisiertes Präparat mit einem fakultativen Gehalt an einem therapeutisch üblichen Träger, Verdünnungsmittel und/oder Hilfsstoff.
7. Therapeutikum nach einem der Ansprüche 1 bis 5 als flüssiges Präparat, insbesondere als Infusionspräparat, vorzugsweise auf wäßriger Basis, gegebenenfalls erhältlich durch Aufnahme des Therapeutikums gemäß Anspruch 6 in Wasser oder Saline.
8. Therapeutikum nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur Therapie von Erkrankungen des Nervensystems.
9. Therapeutikum nach einem der Ansprüche 1 bis 7 zur Therapie von Secondary Non-Responders.
10. Therapeutikum nach einem der Ansprüche 1 bis ⁷/₈ zur Therapie von
 - Dystonien, insbesondere Torticollis spasmodicus oder Blepharospasmus,
 - Spastizitäten, insbesondere Spitzfuß,
 - hämifascialen Spasmen,

- Migräne,
- Lumbalgie,
- Cervicalsyndrom oder
- Hypersalivation.

11. Therapeutikum nach einem der Ansprüche 1 bis 7 für kosmetische Indikation, insbesondere Hyperhydrose oder ausgeprägte Faltenbildung im Gesichtsbereich.
12. Therapeutikum nach einem der Ansprüche 1 bis 7 zur Therapie von Patienten mit neutralisierenden Antikörpern gegen einen Botulinum-Komplex.
13. Therapeutikum nach Anspruch 1 zur Therapie von Patienten mit neutralisierenden Antikörpern gegen einen Botulinumtoxin-Komplex von Clostridium botulinum Typ A.
14. Therapeutikum nach Anspruch 3 zur Therapie von Patienten mit neutralisierenden Antikörpern gegen einen Botulinumtoxin-Komplex von Clostridium botulinum Typ B.

THIS PAGE BLANK (USPTO)